

氏 名	南 圭一
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	博甲第1030号
学位授与の日付	平成20年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	網羅的な遺伝子およびマイクロRNAの発現変動解析による薬物誘導性肝障害発症予測
論文審査委員（主査）	横井 毅（医学系研究科・教授）
論文審査委員（副査）	辻 彰（自然科学研究科・教授），松永 司（自然科学研究科・教授）， 加藤 将夫（自然科学研究科・准教授），中島 美紀（医学系研究科・准教授）

Abstract

In the field of gene expression analysis, microarray has a major impact on many different areas including toxicogenomics. In this study, I investigated the mechanisms and prediction of drug-induced hepatotoxicity by microarray technology. I investigated the changes of hepatic gene expression in 5 typical hepatotoxicants administered rat. I identified 20 genes as the potential markers of hepatotoxicity and the specific profiles of gene expression patterns in each hepatotoxicant from the Quality-Threshold (QT) clustering analysis. In the experiment of various dosage of thioacetamide (TA), it was demonstrated that gene expression pattern detected by hierarchical clustering and QT clustering analyses based on dosing time were changed in an early (6 and 12 h) and a late (24, 36 and 48 h) phase. QT clustering analysis based on their dosage showed the same profiles observed in my previous study in independent of the dosage of TA. These findings suggested that the major gene expression profile estimated by QT clustering would be a sensitive marker of hepatotoxicity. For the further experiment, microRNA (miRNA) changes in TA-administered rat liver were measured by miRNA microarray. The expression change of miR-21, one of the candidate miRNA, were observed not only in TA administration but also in other hepatotoxicant administration. The effect of miR-21 suppression by antisense oligonucleotide were evaluated in *in vitro*. Statins-induced cell cytotoxicity was significantly reduced in miR-21 antisense oligonucleotide transfected group. These findings suggested that miR-21 would prevent statin-induced cytotoxicity. (236 words)

学位論文要旨

薬物誘導性肝障害の予測は患者の安全性確保のみならず、創薬の効率化においても重要である。薬物誘導性の有害事象に対して遺伝子発現変化の網羅的な検討を通じて、毒性を早期に予測することを目的としたトキシコゲノミクスの研究が注目されている。DNA マイクロアレイは膨大な数の遺伝子を網羅的に検討することができる技術であり、毒性学を含む様々な基礎的研究から、特定の治療法や薬物の感受性などを評価する体外診断薬として

も応用されている。現在では特定の機能を持つ遺伝子群を搭載したものから、expression sequence tag (EST)を含む whole genome を搭載したものまで、用途に合わせた多くの DNA マイクロアレイが販売されている。また、その技術は生体内に存在する小さな RNA の一種であるマイクロ RNA (miRNA)の網羅的な検出にも応用されている。本研究では、肝毒性化合物を投与したラット肝試料についてマイクロアレイを用いて遺伝子または miRNA の網羅的発現変動を検討し、その結果から肝障害に特徴的な兆候を見出すことで、薬物誘導性肝障害の予測を行うことを目的とした。

典型的な 5 種類の肝毒性化合物であるアセトアミノフェン (APAP)、プロモベンゼン (BB)、四塩化炭素 (CT)、ジメチルニトロソアミン (DMN)、チオアセタミド (TA)による肝障害ラットモデルを作成した。それぞれの化合物を投与後 6, 12, 24 および 48 時間において肝および血清を採取した。肝障害発症の評価には、主に血清生化学マーカー値の ALT, AST を指標として用いた。生化学マーカー値が最も上昇した時間を毒性発症時間と定義し、APAP では 12 時間、BB では 24 時間、CT では 6 時間、DMN では 48 時間、TA では 24 時間をそれぞれの薬物の毒性発症時間とした。肝より得た total RNA を用い、薬物動態関連遺伝子を中心に搭載したマイクロアレイを使用して遺伝子発現変動を検討した。データ解析として最初に、血清検査値の変動と関連した発現変動を示す遺伝子の特定を行った。抽出されてきた遺伝子群より、誘導または抑制された遺伝子をそれぞれ 10 種類見出した。さらに、quality threshold (QT)クラスタリングによって各化合物投与後の主要な遺伝子発現の変動パターンを検出したところ、毒性発現時間を反映した結果になることを見出した。検出されたクラスターの中には血清検査値の変動と関連した遺伝子として特定された遺伝子が 20 種類中 17 種類含まれていた。これらの結果から QT クラスタリングによる検討が血清検査値の変動をもとにした毒性発現時間に基づく検討と関連することが新たに示された¹⁾。

次に、5 種類の肝毒性化合物を用いた検討により見出された解析手法が、肝毒性化合物の投与量を変化させた際にも適用できるかどうかを検討した。肝毒性が顕著であった TA を 50、150 および 400 mg/kg 体重の 3 段階の投与量で処置し肝障害ラットモデルを作成した。サンプルの採取は先の検討に準じ、血清生化学マーカーの測定によって、TA 投与量依存的に肝障害が発生していることを確認した。続いて、肝から抽出した total RNA を用い、EST を含む約 10,000 遺伝子を搭載したマイクロアレイによって遺伝子発現変動を検討した。全投与群、各投与量でそれぞれ階層クラスタリングを行った結果、どちらの分類によるクラスタリングにおいても毒性発現の前後で遺伝子発現変動が大きく異なることが示された。また、各時間での QT クラスタリングを行い、毒性発現前では投与量に関係なく遺伝子発現変動に差異はないが、毒性発現後には遺伝子発現変動の程度が投与量依存的に増加することが示された。さらに、各投与量別での QT クラスタリングによって遺伝子発現変動の主要なパターンを検出した結果、投与量依存的に毒性発現時間と関連したパターンが得られることが示された。このことは、先に述べた解析手法の有用性を支持するものであった。さらに、5 種類の肝毒性化合物投与モデルにおける血清検査値の結果から見出された遺伝

子は、ほぼ全て同様の発現変動プロファイルを示した。その相対的変動量は投与量に関係なく同等の応答性を示し、鋭敏な肝障害のマーカーになりうることが示唆された²⁾。

さらに、マイクロアレイによる検討から見出された遺伝子が肝障害の発現に関与しているかについて検討した。RNA interference (RNAi)によるノックダウンを用い、TAの毒性に及ぼす影響について、ラット肝由来細胞 BRL 3A を用いて検討した。In vivo における発現変動と BRL 3A 細胞における発現量を考慮し、T-cell death associated gene (Tdag) を標的とした。Tdag siRNA をトランスフェクションし RNAi 効果の確認を real-time RT-PCR にて行った結果、導入後 24 時間で最大 1%以下までの強力な遺伝子抑制が確認された。ほぼ同一の条件を用いて、Tdag のノックダウンした状態で TA を 24 時間曝露し、細胞毒性に及ぼす影響を検討したが、毒性への影響が認められなかった。In vivo と in vitro での TA への応答性の違いが示唆された。

遺伝子レベルの検討と並行して、現在多くの分野で盛んに検討が進められている miRNA について検討を行った。miRNA は近年その働きが注目されている機能性の non-coding RNA であり、miRNA の配列と相同性を持つ遺伝子の主に 3'非翻訳領域に作用して翻訳抑制による転写後調節を行っている。遺伝子のイントロン部分に存在するものや、独自のクラスターを形成するものがあり、その変動を検討することは遺伝子の発現変動の検討と同様に意義のあることである。肝毒性化合物の投与による miRNA の発現の変化を検討するため、miRNA マイクロアレイを用いた。TA を 400 mg/kg 体重で投与後 1, 2, 6 および 12 時間において変動する miRNA を探索した。その結果見出された miRNA について、real-time RT-PCR にて発現を確認し、毒性に関与する miRNA として、miR-21 を見出した。APAP, BB, CT, DMN について同様の時間において発現変動を測定したところ毒性発症時間の早い APAP および CT では早期の発現増加が、毒性発症時間がやや遅い BB, DMN および TA では発現の抑制が認められた。これらの結果から、miR-21 が毒性発症時間に合わせて異なった発現変動をしていることが示された。さらに miR-21 が実際に肝障害に関与しているかについて in vitro 実験系を用いて検討した。細胞内の miR-21 をアンチセンスオリゴ (AsO)を用いて抑制し、薬物による細胞障害性への影響を検討した。この miR-21 はガン化によって発現が大きく増加することが知られているため、複数のヒト由来細胞株における miR-21 の発現量を測定した。その結果から、AsO の影響が検出しやすいように発現の低い HeLa 細胞を選択した。AsO 導入による抑制効果を real-time RT-PCR にて確認した後、同様の条件で AsO を 72 時間導入後に薬物を 24 時間曝露し細胞生存率を測定した。この際、miR-21 の標的蛋白質を予測サイトを用いて探索したところ、peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α)が考えられた。そこで、PPAR α のアゴニストであるフィブラート系薬物との併用によって横紋筋融解症が報告されているスタチン系薬物を被験薬として用いた。水溶性のプラバスタチン、フルバスタチンと脂溶性のシンバスタチン、ロバスタチンを用いた。その結果、シンバスタチン、ロバスタチンにおいて細胞障害性が miR-21 の AsO 導入によって増強され、プラバスタチン、フルバスタチンでは細胞障害性が見られなかった。しかしながら、標的

遺伝子として検討した□□□□αは□□□□の発現は認められたものの、蛋白質に対する影響を検出することはできなかった。これらの結果から、miR-21 が関与する蛋白質は不明ではあるが、その働きは細胞の保護作用であることを薬物誘導性細胞障害の視点から明らかにした。

薬物誘導性肝障害は新薬開発において大きな障害となり、その予測は非常に重要である。本研究では DNA マイクロアレイを用いた肝毒性評価の検討から、肝毒性予測の可能性を検討した。本研究で構築された新しい DNA マイクロアレイデータの解析をさらに進展させることによって、新薬開発における、薬物誘導性肝障害を起こす化合物の前臨床段階でのスクリーニングの有効な手段になることが期待される。また、miRNA という新しい分野において、薬物誘導性肝障害に及ぼす影響をいち早く検討した報告として、今後の miRNA の機能解析の一助となるものと考えられる。

参考文献

1) Minami K, Saito T, Narahara M, Tomita H, Kato H, Sugiyama H, Katoh M, Nakajima M, and Yokoi T.

Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats.

Toxicological Sciences. 87(1):296-305; 2005.

2) Minami K, Maniratanachote R, Katoh M, Nakajima M, and Yokoi T.

Simultaneous measurement of gene expression for hepatotoxicity in thioacetamide-administered rats by DNA microarrays.

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 603(1):64-73; 2006.

学位論文審査結果の要旨

薬物誘導性肝障害の予測は患者への安全性確保だけでなく、創薬の効率化においても重要である。トキシコゲノミクスは、薬物誘導性の有害事象に対し遺伝子発現変化の網羅的な検討を通じて、毒性を早期に予測することを目的としている。本検討において、典型的な肝毒性化合物であるアセトアミノフェン (APAP)、ブロモベンゼン (BB)、四塩化炭素 (CT)、ジメチルニトロソアミン (DMN) およびチオアセタミド (TA) を投与したラットを用い、遺伝子発現の経時的な変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に検討した。血清生化学検査値から推定された肝障害発症時間において、複数の肝毒性化合物に共通して変化する遺伝子を見出した。Quality threshold (QT) クラスタリングによって見出された主要な発現変動プロファイルにおいても同様で、血清生化学検査値を反映していた。さらに、投与量を変化させて、階層クラスタリングによる検討を行った結果、投与量に関係なく毒性発症時間である 24 時間を境界にクラスターが形成されることを見出した。さらに、投与量に関係なく血清生化学検査値を反映した遺伝子発現変動プロファイルを示し、その変動の程度は投与量依存性が認められた。これらのことから、QT クラスタリングによる主要な遺伝子発現変動パターンの検討が薬物誘導性肝障害の有効なマーカーとして使用できる可能性が示された。さらに、マイクロ RNA (miRNA) マイクロアレイを用いた検討も行った。本研究成果はトキシコゲノミクスの手法によるバイオマーカーの同定と毒性予測に対して新たな知見を提供したものであると評価され、博士 (薬学) に値すると判定した。